

既存添加物「酸化防止剤」の製法による抗酸化能及び主要成分の変動解析

天然酸化防止剤の製法による成分変動解析と構造解明

天然酸化防止剤の製法による抗酸化能の変動解析

生コーヒー豆抽出物に関する検討

分担研究者 天倉吉章 松山大学薬学部 准教授

好村守生 松山大学薬学部 助教

研究要旨

既存添加物名簿収載の酸化防止剤生コーヒー豆抽出物の製法による成分分布を精査する目的で、水、50%エタノール、エタノール抽出物の含有成分および抗酸化活性について比較検討を行った。まず含有成分を明らかにするために、各抽出物について HPLC 分析を行ったところ、全抽出物において2本の主ピークが観察され、標品との直接比較により、chlorogenic acid, caffeine と同定した。その他の成分として、カフェー酸誘導体（4-O-caffeoylquinic acid, 5-O-caffeoylquinic acid, 3,5-di-O-caffeoylquinic acid）が同定された。各抽出物について抗酸化活性（ORAC 活性）を評価したところ、全体的に抗酸化能が認められ、エタノール抽出が最も強く、次いで50%エタノール抽出物、水抽出物の順であった。これらの抗酸化活性成分を明らかにするために、抽出物の分画物（*n*-ヘキサン、酢酸エチル、水各分画物）を調製し、抗酸化活性を評価した。その結果、水分画物が最も強く、次いで酢酸エチル分画物が抗酸化活性を示した。一方、*n*-ヘキサン分画物はほとんど活性を示さなかった。水分画物の HPLC 分析を行ったところ、主成分の chlorogenic acid, caffeine およびカフェー酸誘導体が検出された。Caffeine の ORAC 値は低いことから、コーヒー豆抽出物の有効（指標）成分として、chlorogenic acid を主としたカフェー酸誘導体が示唆された。

研究協力者

吉田隆志 松山大学薬学部 教授

A. 研究目的

コーヒーは、茶、ココアなどとともに世界中で飲用されている重要な嗜好品の一つである。熱帯地域で栽培されるアカネ科コーヒーノキを基原植物とし、その種子をコーヒー豆呼んで飲料とする。コーヒー豆の栽培種は *Coffea arabica* が主で、成分としてはカフェ

イン、クロロゲン酸や脂肪酸が知られている。コーヒーの飲用は、眠気覚ましなど薬用からはじまっており、現在では抗菌、抗酸化、糖尿病性合併症予防効果など多様な機能が研究されている。

一方、食品添加物としても利用されており、生コーヒー豆抽出物として、酸化防止剤、製造用剤を用途に既存添加物名簿に収載されている。既存添加物名簿に生コーヒー豆抽出物は、「アカネ科コーヒー (*Coffea arabica*

LINNE) の種子より、温時アスコルビン酸又はクエン酸酸性水溶液で抽出して得られたものである。有効成分は、クロロゲン酸及びポリフェノールである」と記載されている。

本研究では、抽出溶媒として使用頻度の高いエタノール、含水エタノール、水を用い、それらを使用した製法と有効性(指標成分)の関係を確認するための科学的データの追及を目的に検討を行った。

B. 研究方法

1. 試料および試薬

生コーヒー豆の原料は、長岡香料株式会社より供与いただいたものを用いた。試薬はすべて特級または高速液体クロマトグラフィー用を用いた。標品の *caffeine* はフナコシより得た。*カフェー酸誘導体* (*chlorogenic acid*, *4-O-caffeoylquinic acid*, *5-O-caffeoylquinic acid*, *3,5-di-O-caffeoylquinic acid*) はヒマワリ種子抽出物より単離同定されたものを用いた。

2. 装置及び測定条件

逆相 HPLC (分析) : Shimadzu Prominence システム (島津製作所) を使用した。カラム : L-column ODS (2.1 I.D. × 150 mm, 5 μm) (化学物質評価研究機構), カラム温度 : 40°C, 流速 : 0.3 mL/min, 測定波長 : 200–400 nm, 移動相 : (A) 5% 酢酸水溶液および (B) アセトニトリル [濃度勾配条件 (B in A) : 0→30 min (0→50%), 30→35 min (50→85%), 35→40 min (85%), 40→50 min (85→90%), 50→55 min (90→100%), 55→60 min (100%)].

3. 試料の調製

原料のコーヒー豆をブレンダーで粉碎し、その 2 g に水、50%エタノール、エタノール (40 mL) をそれぞれ加え、20 分間超音波処理した。抽出液を吸引ろ過し、得られたろ液を濃縮後、凍結乾燥または減圧乾燥し、各試料 (水抽出物、50%エタノール抽出物、エタ

ノール抽出物) とした。

分画用の試料は、コーヒー豆 (50 g) をブレンダーで粉碎し、80%エタノール [エタノール-水 (8:2)] (500 mL) で抽出後、*n*-ヘキサン (150 mL), 酢酸エチル (150 mL) で順次分画した。各分画物を濃縮し、分画濃縮物 [*n*-ヘキサン分画物 (251 mg), 酢酸エチル分画物 (308.5 mg), 水分画物 (1.5 g)] を得た。

化合物の同定は、標品との直接比較により行った。

4. 抗酸化活性

抗酸化活性は、ORAC (oxygen radical absorbance capacity) により評価した。各試料 3 回測定し、その平均値を活性値とした。

ORAC : マイクロプレートの各ウェルに試料溶液 20 μL, 94.4 nM fluorescein/75 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 200 μL, 320 mM 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) 溶液 75 μL を入れて振とうさせた後、37°C でインキュベートしながら 2 分間隔で 90 分間経時的に蛍光度 (Em.: 520 nm, Ex.: 485 nm) を測定し、試料重量当り ORAC 値を算出し、Trolox 当量 (μmol TE/g) で表した。

C. 研究結果

1. 調製抽出物の成分分布

調製した生コーヒー豆の抽出物 (水、50%エタノール、エタノール抽出物) の HPLC クロマトグラムを比較した。その結果を図 1 (a~c) に示す。ほぼ全ての抽出物において、2 つの主要ピーク (保持時間 約 10, 16 分) が共通して観察された。これらピークについて、標品と照合しながら精査したところ、*chlorogenic acid* (2), *caffeine* (4) とそれぞれ同定した。その他の成分として、*5-O-caffeoylquinic acid* (1), *4-O-caffeoylquinic acid* (3), *3,5-di-O-caffeoylquinic acid* (5) が検出され

た。1 から 5 の化学構造式を図 2 に示す。分画試料用に調製した 80%エタノール抽出物の分画物 (*n*-ヘキサン, 酢酸エチル, 水各分画物) についても HPLC 分析を行った [図 1 (d~g)]。その結果, *n*-ヘキサン分画物ではピーク強度は弱いながら 4 が検出され, 酢酸エチル分画物では 4 とともに, カフェー酸誘導体, 水エキスでは上述した全ての化合物が観察された。

2. 抗酸化能の検討

抽出条件による抗酸化能を比較するために, 各抽出物 (水, 50%エタノール, エタノール抽出物) について抗酸化活性を評価した。抗酸化能は ORAC 値を指標とした。その結果を図 3 に示す。ORAC 測定の結果, 全体的に強い抗酸化能が認められたが, 水のみよりもエタノールを含む溶媒抽出物の方の活性が強い傾向が認められた。成分分布と抗酸化活性の関係を明確にするために, 調製した各分画物 (*n*-ヘキサン, 酢酸エチル, 水各分画物) についても, 同様に ORAC 値を測定した。その結果, 水分画物の抗酸化活性が最も強く, 次いで酢酸エチル分画物に活性が認められた。一方で, *n*-ヘキサン分画物にはほとんど抗酸化能は認められなかった。

図 1 (g) に示すように, 活性の強かった水分画物にはカフェー酸誘導体が顕著に検出されており, chlorogenic acid (3) を主としたカフェー酸誘導体が有効 (指標) 成分である可能性が示唆された。

D. 考察

各抽出物の中では, 水のみよりもアルコールまたは含水アルコールを抽出溶媒とした抽出物が, より抗酸化能の高い結果となった。分画物の抗酸化活性においては, 水分画物が顕著に強かった。その含有成分をみると, chlorogenic acid (3) の主ピークが検出された。本研究の中で, ヒマワリ種子抽出物について,

同様の検討を行っており, 3 などのカフェー酸誘導体について, ORAC 測定を実施しており, それらの強い抗酸化能を確認している。一方で, 共存する caffeine (4) であるが, チャ抽出物の項で本化合物については抗酸化活性をほとんど示さないことを既に確認しており, それゆえ, 本抽出物の抗酸化活性本体についても, これらカフェー酸誘導体の寄与が示唆される。

既存添加物名簿には, 本添加物については「有効成分は, クロロゲン酸及びポリフェノールである」とあるが, 本研究結果からもこれを支持する同様のデータが得られた。

以上の結果から, 生コーヒー豆抽出物を調製する場合, 水のみよりもアルコールまた含水アルコールで抽出する方が高抗酸化能であることが示唆され, また指標成分として 3 を主成分としたカフェー酸誘導体の抽出効率をよくすることで, 抗酸化能の向上がはかれることが考察された。

E. 結論

酸化防止剤生コーヒー豆抽出物の製法による成分分布と抗酸化能に関する基礎研究として, 生コーヒー豆の水, 50%エタノール, エタノール抽出物について比較検討した結果, いずれからも主成分として, chlorogenic acid (3), caffeine (4) が検出された。抗酸化能を ORAC 測定により評価した結果, ほぼ全ての抽出物で抗酸化能を示したが, 水のみよりもアルコールまたは含水アルコールで抽出したものの方が高抗酸化能を示した。抽出物の分画物 (*n*-ヘキサン, 酢酸エチル, 水分画物) について, 抗酸化能を評価したところ, 水, 酢酸エチル分画物の順に活性が強かった。水分画物について含有成分を分析した結果, 3 が主成分として検出され, その他のカフェー酸誘導体もマイナー成分として検出され, これらが抗酸化能に寄与していることが示唆された。

F. 参考文献

- 1) 奥田拓男編「天然薬物事典」，廣川書店，東京，1981.
- 2) 平成19年度厚生労働科学研究費補助金研究報告書「既存添加物の成分と品質評価に関する研究(分担報告書 チャ抽出物の抗酸化成分に関する研究).

F. 研究業績

1. 論文発表

現在のところなし

2. 学会発表

現在のところなし

G. 知的財産権の出願・登録状況

現在のところなし

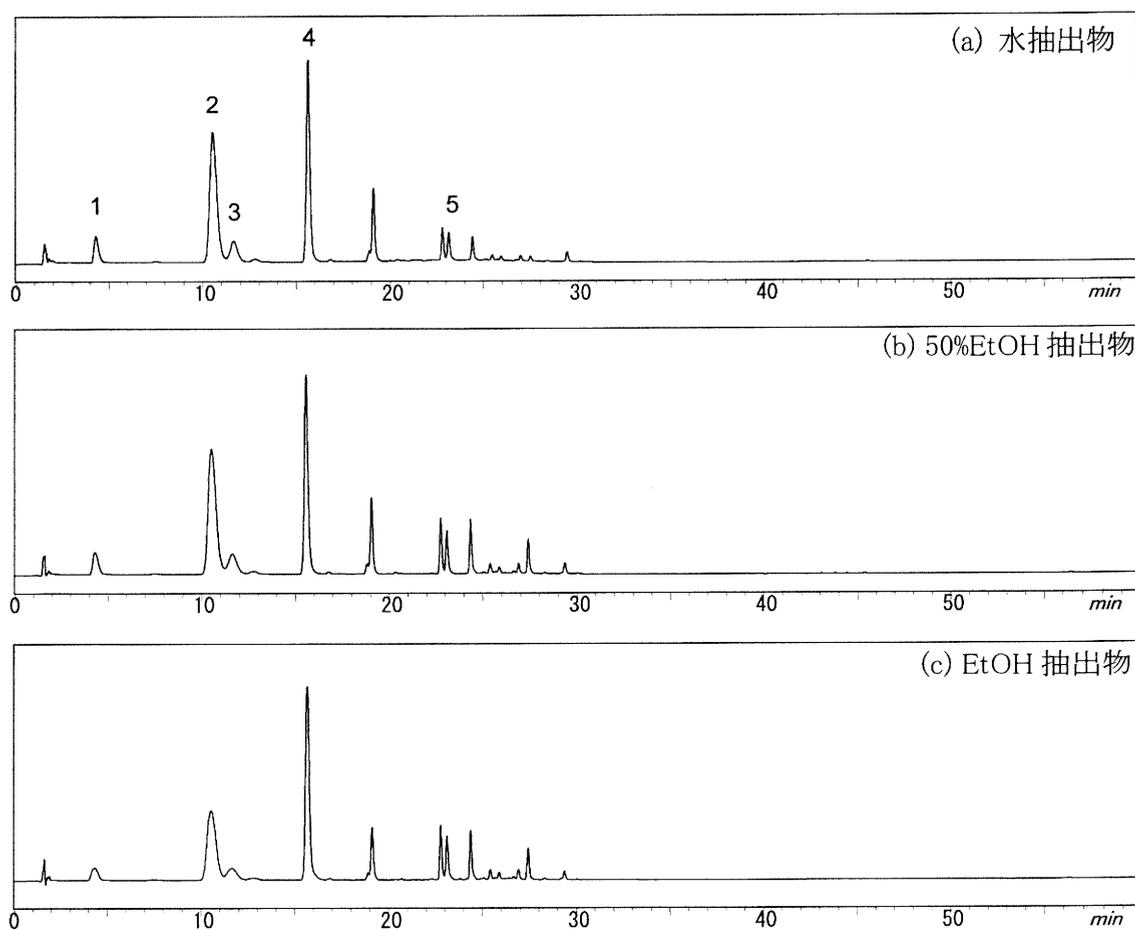


図 1. コーヒー豆抽出物の逆相 HPLC クロマトグラム (検出波長: 280 nm)

(a) 水抽出物, (b) 50%エタノール抽出物, (c) エタノール抽出物 (クロマト中の数字は化合物番号を示す)

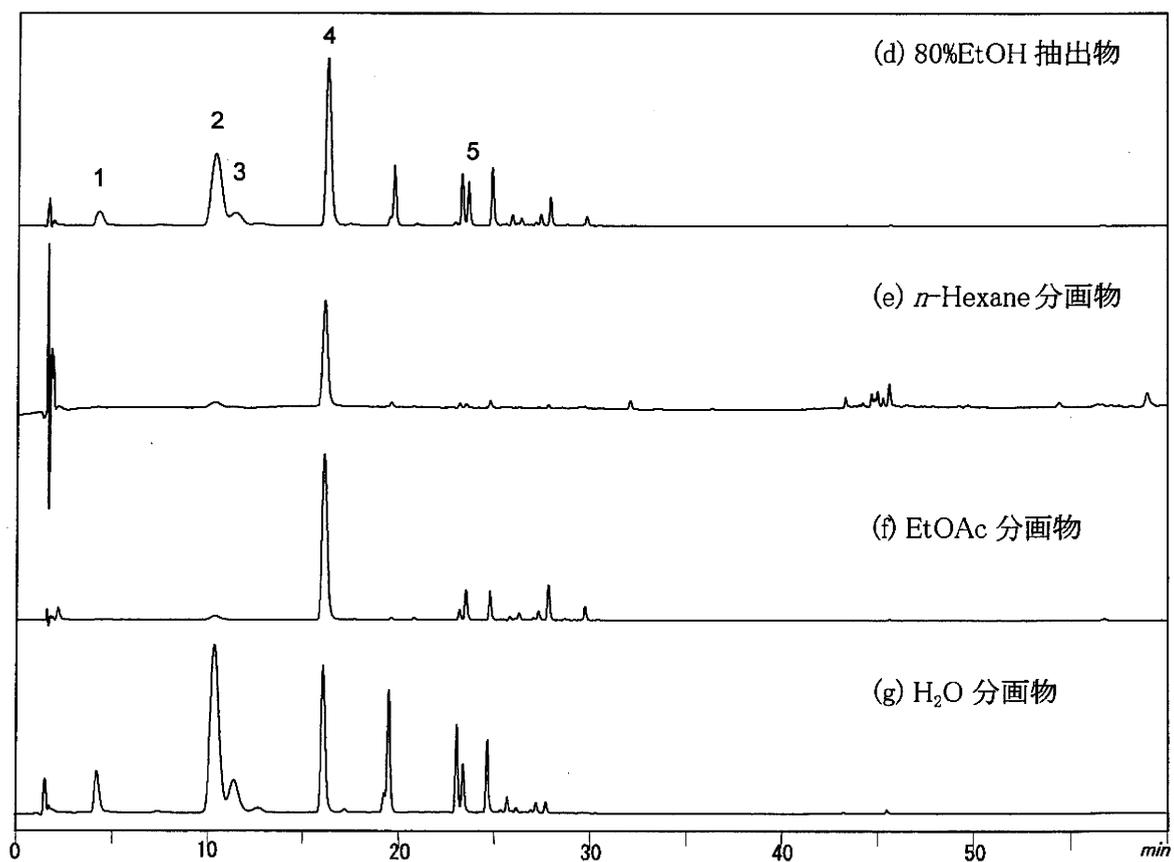


図 1(続き). コーヒー豆抽出物の逆相 HPLC クロマトグラム(検出波長: 280 nm)
 (d) 80%エタノール抽出物, (e) 80%エタノール抽出物-*n*-ヘキサン分画物, (f) 80%エタノール抽出物-酢酸エチル分画物, (g) 80%エタノール抽出物-水分画物 (クロマト中の数字は化合物番号を示す)

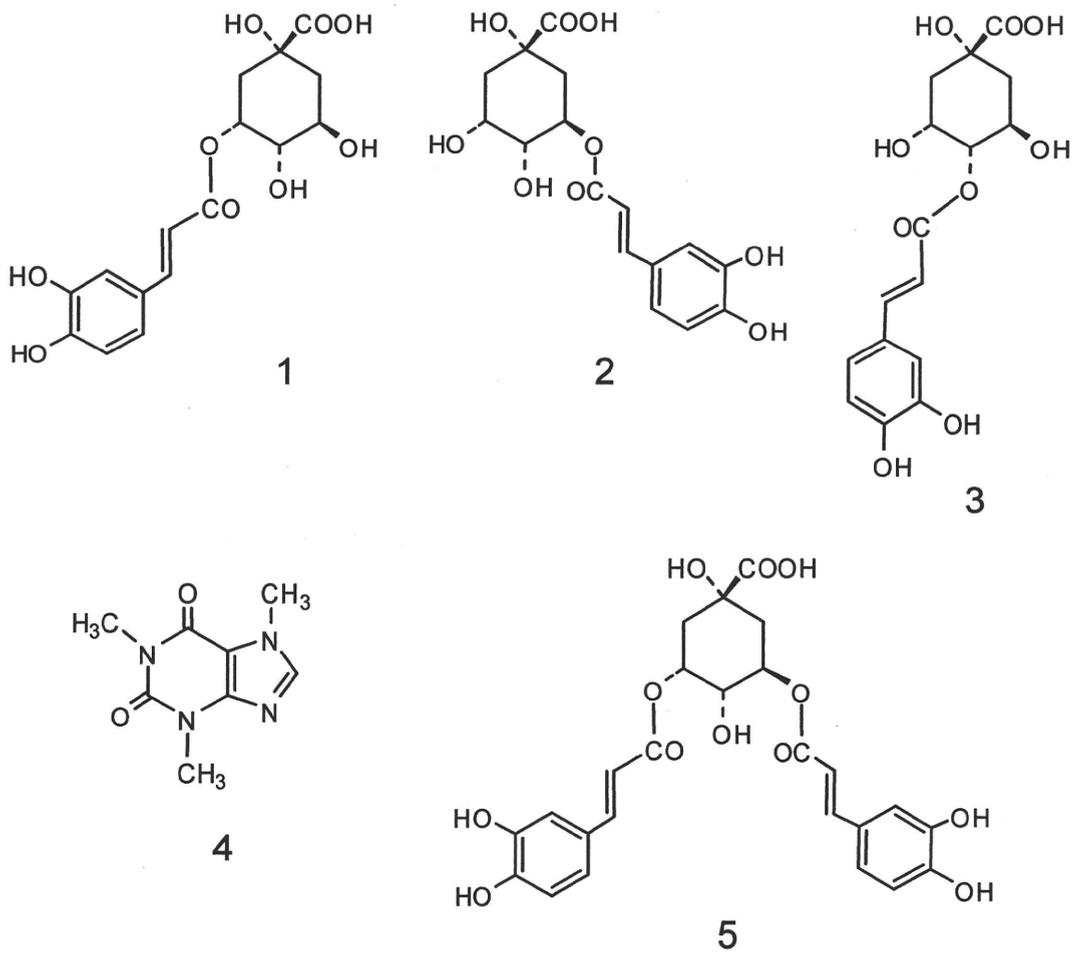


図 2. 化合物 1~5 の化学構造

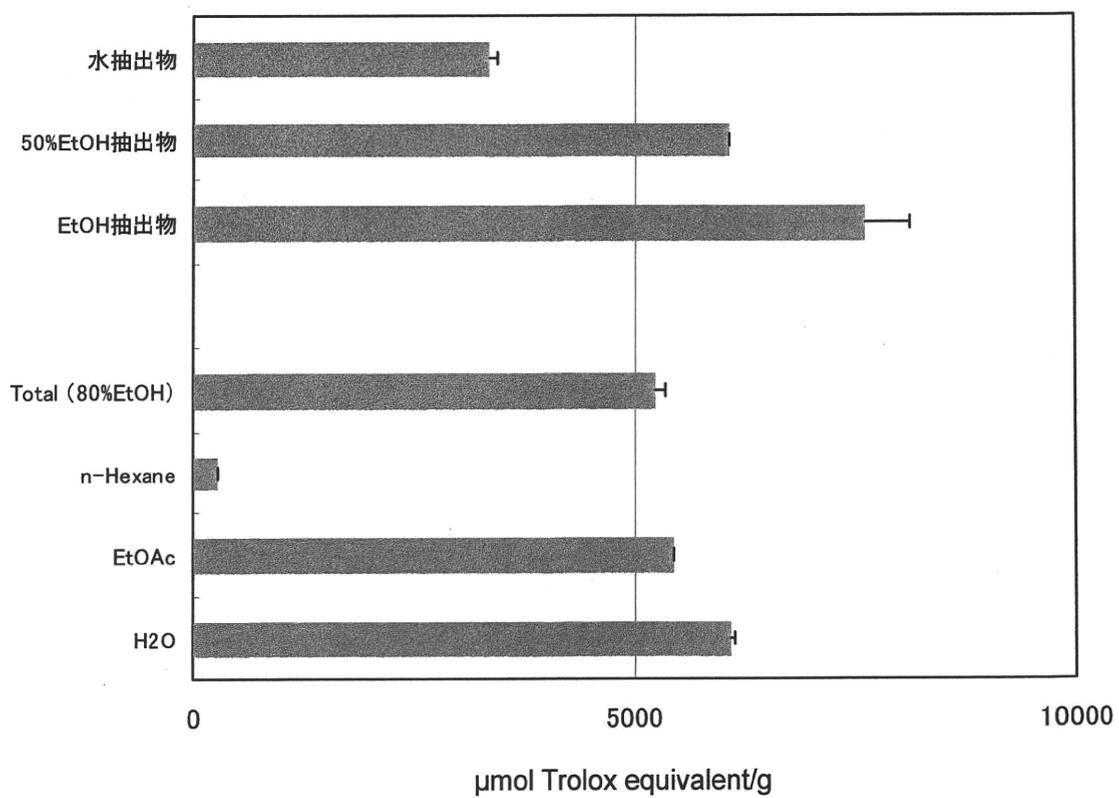


図3. 抗酸化能(ORAC 値)
各抽出物および分画物

既存添加物「酸化防止剤」の製法による抗酸化能及び主要成分の変動解析

天然酸化防止剤の製法による成分変動解析と構造解明

天然酸化防止剤の製法による抗酸化能の変動解析

ヤマモモ抽出物に関する検討

分担研究者 好村 守生 松山大学薬学部 助教

天倉 吉章 松山大学薬学部 准教授

研究要旨

既存添加物名簿記載の酸化防止剤「ヤマモモ抽出物」の品質規格作成に供する基礎的な研究の一環として、熱水、含水エタノール（50%、80%）、エタノールまたはメタノールを用いた抽出エキスを調製し、それらの抗酸化能をORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) 法で評価した。その結果、80%エタノール抽出物に最も強い活性を認めため、抗酸化活性を指標とした詳細な成分精査を行い、3種の文献未記載の化合物 [myricanone 5-O-(6'-O-galloyl)-glucoside, myricanol 11-O-sulfate, juglanin B 11-O-sulfate] を含む14種の化合物 [myricitrin, myricanol, myricanone, gallic acid, myricetin, prodelphinidin B-2 3,3'-di-O-gallate, epigallocatechin 3-O-gallate, actinidione, myricetin 3-O-(2"-O-galloyl)-rhamnoside, (R)-, (S)-myricanol 5-O-(6'-O-galloyl)-glucoside] を単離し、構造を明らかにした。これらの化合物を標準試料としたHPLCによる各抽出エキス（熱水抽出物、50%エタノール抽出物、80%エタノール抽出物、エタノール抽出物、メタノール抽出物）との直接比較から、各抽出エキスの主要成分はmyricitrinであり、この成分が本添加物の抗酸化活性に大きく寄与していることが示唆された。また、80%エタノール抽出物の分画物のうち、その過程で形成された沈殿物及び酢酸エチル分画物に強い抗酸化活性が認められ、成分分析から、沈殿物ではmyricitrin、酢酸エチル分画物ではmyricitrin, myricanol, epigallocatechin 3-O-gallate及びその2量体を主構成成分として認めた。このことから、これらの活性がヤマモモ抽出物の強い抗酸化活性に寄与していると考えられる。

研究協力者

吉田 隆志 松山大学薬学部 教授

A. 研究目的

天然添加物の多くは植物抽出エキスであり、その抽出方法によってエキス中に含まれる成分組成が大きく異なることが予想される。酸化防止剤として既存添加物名簿に記載されているヤマモモ抽出物は、「ヤマモモ科

ヤマモモ (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) の果実、樹皮又は葉より、水、エタノール、又はメタノールで抽出して得られたもの」とされ、その主成分としてはmyricitrinが知られているが、本抽出エキスの調製方法及び使用部位には幅があるため、その範囲内で調製されたエキスが一様の抗酸化活性を示すとは考えにくい。そのため本検討においては、抗酸化活性を指標とした各抽出エキスの活性比較を

行うことで酸化防止剤としての本抽出エキスの機能を高めるとともに、主要含有成分を明らかにすることで品質規格作成に供するための基礎的なデータ収集を目的とした検討を行った。

B. 研究方法

1. 試料及び試薬

原料となるヤマモモ樹皮は長岡香料株式会社より恵与いただいたものを使用した。

分離、精製に使用したカラム充填剤は Diaion HP-20 (三菱化学), Toyopearl HW-40 (東ソー), YMC GEL ODS-AQ12S50 (ワイエムシィ), Sephadex LH-20 (GEヘルスケア), Cosmosil 75C18 (ナカライテスク) で、その他の試薬はすべて特級または高速液体クロマトグラフィー用を用いた。

糖の確認反応に用いた L-cystein methyl ester hydrochloride, *o*-tolyl isothiocyanate は和光純薬工業株式会社製を用いた。

ORAC 測定に使用した AAPH [2,2'-azobis-(2-amidinopropane)-dihydrochloride] は和光純薬工業株式会社製を、Fluorescein sodium salt 及び trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) は Sigma-Aldrich 社製を用いた。

2. 装置及び測定条件

逆相 HPLC は Shimadzu LC-10Avp システム (島津製作所) を使用した。測定条件は以下のとおり。

【成分分析】カラム: YMC-pack ODS AQ-3C2 (2.0 I.D.×150 mm) (ワイエムシィ), カラム温度: 40°C, 流速: 0.25 mL/min, 測定波長: 280 nm, 試料注入量: 3 µL, 移動相: (A) 0.01 M H₃PO₄; 0.01 M KH₂PO₄ (1: 1) 及び(B) メタノール [濃度勾配条件: 0→30 min (B: 0→50%), 30→50 min (B: 50→60%), 50→75 min (B: 0%)]

【糖の分析】カラム: COSMOSIL Cholester

Waters (2.0 I.D.×150 mm) (nacalai tesque), カラム温度: 40°C, 流速: 0.25 mL/min, 測定波長: 250 nm, 試料注入量: 2 µL, 移動層: 0.01 M H₃PO₄; 0.01 M KH₂PO₄; メタノール (37.5: 37.5: 25).

蛍光測定に使用したマイクロプレートリーダーは Infinite F200 (TECAN 社製) を用い、励起波長: 485 nm, 測定波長: 535 nm, 37°C で開始から 2 分毎に 90 分後まで測定を行った。

NMR は Bruker AVANCE500 (ブルカー・バイオスピン社製) (¹H-NMR: 500 MHz, ¹³C-NMR: 126 MHz) を使用し、測定溶媒として acetone-*d*₆, MeOH-*d*₄, DMSO-*d*₆ を用いた。ケミカルシフトはそれぞれの溶媒由来ピーク [acetone-*d*₆ (¹H: 2.04 ppm, ¹³C: 29.8 ppm), MeOH-*d*₄ (¹H: 3.30 ppm, ¹³C: 49.0 ppm), DMSO-*d*₆ (¹H: 2.50 ppm, ¹³C: 39.5 ppm)] を基準とした。

高分解能 (HR) ESI-MS は micrOTOF-Q (ブルカー・ダルトニクス社製) を使用し、測定溶媒にメタノールあるいはアセトニトリルを用いた。

3. 抗酸化活性

抗酸化活性は ORAC (oxygen radical absorbance capacity) 法により評価した。測定方法は以下の通り。

マイクロプレートの各ウェルに試料溶液 20 µL または trolox 標準溶液 (6.25~50 µM), 94.4 nM fluorescein/75 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 200 µL を加え、37°C で 15 分加温した。予め 37°C に加温した 75 mM リン酸緩衝液で 31.7 mM AAPH (8.6 mg/mL) を調製し、各ウェルに 75 µL を加えて攪拌、37°C でインキュベートしながら 2 分間隔で 90 分間経時的に蛍光強度 (励起波長: 485 nm, 測定波長: 535 nm) を測定した。0 分の蛍光強度値 (*f*₀) を 1 とした各時間の相対強度から area under the curve (AUC) を算出し、それぞれの値から

blank の値を差し引いた後 (net AUC_{trolox}, net AUC_{sample}), trolox 標準溶液から得た 2 次回帰式から trolox 相当量 [$\mu\text{mol TE}$ (trolox equivalent)/g] を算出した。

各試料 3 回以上測定を行い、その平均値を活性値とした。

4. 抽出エキスの調製

Myrica rubra の樹皮粉砕物 1 g を 50% エタノール, 80% エタノール, エタノール, メタノール 各 10 mL で 48 時間冷浸抽出を行い、ろ過、濃縮後、凍結乾燥して分析及び抗酸化活性試験に供した。

5. 化合物の単離

Myrica rubra の樹皮粉砕物を 80% エタノールで 48 時間冷浸抽出し、ろ過、濃縮後、*n*-ヘキサン, 酢酸エチル, *n*-ブタノールで順次抽出を行い、各抽出物を得た。得られた各分画濃縮物のうち酢酸エチル分画物及び *n*-ブタノール分画物について各種カラムクロマトグラフィー [Diaion HP-20, Toyopearl HW40, MCI-gel CHP20P, YMC gel ODS-AQ, Sephadex LH-20] による分離精製を繰り返し化合物の単離を行った。得られた各化合物については順相, 逆相 HPLC での標品との直接比較あるいは文献値との NMR データ等の比較によって同定した。

C. 研究結果及び考察

1. 抗酸化能の評価

熱水抽出物, 50% エタノール抽出物, 80% エタノール抽出物, エタノール抽出物, メタノール抽出物について, ORAC 法を用いた抗酸化能評価を行った結果, 80% エタノール抽出物 (9,757 $\mu\text{mol TE/g}$) に最も強い活性を認めた (図 1)。そのため, ヤマモモ抽出物の主要な抗酸化成分探索の目的で, 80% エタノール抽出物について *n*-ヘキサン, 酢酸エチルで順次溶媒抽出を行い, 同様に ORAC の

測定を行った。また, 分画途中で形成された沈澱は濾取し, 同様に ORAC の測定を行った。その結果, 酢酸エチル分画物 (12,102 $\mu\text{mol TE/g}$) 及び沈澱 (11,711 $\mu\text{mol TE/g}$) に強い活性を認めた (図 2) ため, それらの詳細な成分探索を行った。

2. 抽出エキスの成分精査

Myrica rubra 樹皮粉砕物 450 g を 4.5 L の 80% エタノールで 24 時間冷浸抽出し、ろ過、約 1 L まで濃縮後、*n*-ヘキサン (2.5 L), 酢酸エチル (2.5 L), *n*-ブタノール (2.5 L) で順次抽出を行い、各分画物 [*n*-ヘキサン分画物 (1.7 g), 酢酸エチル分画物 (9.9 g), *n*-ブタノール分画物 (15.6 g), 水層 (20.1 g)] 及び分画途中で形成された沈澱物 (66.7 g) を得た。それらのうち、沈澱物について Mega Bond Elut C18 による分離及び Silica gel TLC による分取を行い myricitrin (1) (307.9 mg), myricanol (2) (100.1 mg), myricanone (3) (5.8 mg) を得た。また、酢酸エチル分画物について各種カラムクロマトグラフィー [Diaion HP-20, Toyopearl HW40, YMC gel ODS-AQ, Sephadex LH-20] による分離精製を繰り返し、単離した化合物について HPLC での標品との直接比較あるいは NMR データ, マススペクトル等の詳細な解析から, それぞれ gallic acid (4) (461.4 mg), myricetin (5) (13.1 mg), prodelphinidin B-2 3,3'-di-*O*-gallate (6) (90.5 mg), epigallocatechin 3-*O*-gallate (7) (134.1 mg), actinidione (8) (13.7 mg), myricetin 3-*O*-(2"-*O*-galloyl)-rhamnoside (9) (32.0 mg), (*R*)-, (*S*)-myricanol 5-*O*-(6'-*O*-galloyl)-glucoside (10) (70.1 mg), (11) (23.5 mg), myricanone 5-*O*-(6'-*O*-galloyl)-glucoside (12) (4.8 mg) と同定した。また、*n*-ブタノール分画物について各種カラムクロマトグラフィー [Toyopearl HW40, YMC gel ODS-AQ, Sephadex LH-20, Cosmosil 75C18] による分離精製を繰り返し、得られた化合物についての NMR データ, マ

ススペクトル等の詳細な解析から myricanol 11-*O*-sulfate (13) (6.5 mg), juglanin B 11-*O*-sulfate (14) (5.3 mg) と同定した。化合物 12, 13, 14 は文献未記載の化合物であったため、その構造決定の詳細について別頁に示す。また、各化合物の構造を図 3 に示す。

Myricitrin (1): $^1\text{H-NMR}$ (MeOH- d_4) δ : 6.94 (2H, s, H-2', 6'), 6.33 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.17 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 5.31 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, Rham H-1), 4.23 (1H, dd, $J = 1.5, 3.0$ Hz, Rham H-2), 3.79 (1H, dd, $J = 3.0, 9.5$ Hz, Rham H-3), 3.51 (1H, m, Rham H-5), 3.35 (1H, t, $J = 9.5$ Hz, Rham H-4), 0.96 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, Rham H-6). $^{13}\text{C-NMR}$ (MeOH- d_4) δ : 179.6 (C-4), 165.7, 163.1, 159.3, 158.4 (C-2, 5, 7, 8a), 146.7 (2C, C-3', 5'), 137.8 (C-4'), 136.3 (C-3), 121.9 (C-1'), 109.6 (2C, C-2', 6'), 105.8 (C-4a), 103.5 (Rham C-1), 99.8 (C-6), 94.7 (C-8), 73.3 (Rham C-4), 72.1, 72.0, 71.8 (Rham C-2, 3, 5), 17.6 (Rham C-6).

Myricanol (2): $^1\text{H-NMR}$ (MeOH- d_4) δ : 7.12 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-18), 7.00 (1H, dd, $J = 2.0, 8.0$ Hz, H-15), 6.81 (1H, s, H-19), 6.76 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-16), 3.94 (1H, t, $J = 9.5$ Hz, H-11), 3.88, 3.83 (each 3H, s, -OMe), 2.79-2.91 (2H, m, H-13), 2.71 (1H, m, H-7), 2.50 (1H, m, H-7), 2.25 (1H, m, H-12), 1.79-1.92 (3H, m, H-8, H-10), 1.60-1.66 (2H, m, H-9, H-12), 1.41-1.55 (2H, m, H-9, H-10). $^{13}\text{C-NMR}$ (MeOH- d_4) δ : 152.6 (C-17), 150.3 (C-5), 148.4 (C-3), 141.0 (C-4), 134.6 (C-18), 131.9 (C-14), 130.6 (C-15), 130.4 (C-19), 126.6 (C-1), 124.3 (C-2), 124.0 (C-6), 117.3 (C-16), 69.1 (C-11), 61.7, 61.5 (each 1C, -OMe), 40.5 (C-10), 35.6 (C-12), 28.0 (C-13), 27.0 (C-8), 26.6 (C-7), 24.1 (C-9).

Myricanone (3): $^1\text{H-NMR}$ (MeOH- d_4) δ : 7.00 (1H, dd, $J = 2.0, 8.0$ Hz, H-15), 6.76 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-16), 6.67 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-18), 6.53 (1H, s, H-19), 3.78, 3.88 (each 3H, s, -OMe), 2.95 (2H, m, H-13, 13), 2.83 (2H, m,

H-12, 12), 2.74 (2H, m, H-10, 10), 2.67 (2H, m, H-7, 7), 1.90 (2H, m, H-8), 1.75 (2H, m, H-9). $^{13}\text{C-NMR}$ (MeOH- d_4) δ : 216.3 (C-11), 153.0 (C-17), 150.4 (C-5), 148.6 (C-3), 141.2 (C-4), 133.8 (C-18), 133.3 (C-14), 130.0 (C-19), 129.6 (C-15), 127.1 (C-1), 124.7 (C-2), 123.8 (C-6), 117.4 (C-16), 61.5, 61.7 (each 1C, -OMe), 46.4 (C-10), 43.3 (C-12), 29.5 (C-13), 27.9 (C-7), 25.7 (C-8), 23.1 (C-9). HR-ESI-MS: 355.1526 ($[\text{M-H}]^-$, Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{O}_5$: 355.1551).

myricetin (5): $^1\text{H-NMR}$ (MeOH- d_4) δ : 7.33 (2H, s, H-2', 6'), 6.36 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.17 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6).

Prodelphinidin B-2 3,3'-di-*O*-gallate (6): $^1\text{H-NMR}$ (MeOH- d_4) δ : 7.06 (2H, s, galloyl-H), 6.95 (2H, br s, galloyl-H), 6.51 (2H, br s, H-2'L, 6'L), 6.49 (2H, s, H-2'U, H-6'U), 6.09, 5.95, 5.91 (each 1H, br s, H-6U, H-8U, H-6L), 5.55 (1H, s, H-2L), 5.39-5.43 (2H, m, H-3L, H-2U), 4.76 (1H, m, H-4U), 3.03 (1H, dd, $J = 4.0, 17.0$ Hz, H-4L), 2.86 (1H, br d, $J = 17.0$ Hz, H-4L). HR-ESI-MS: 937.1467 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, Calcd for $\text{C}_{37}\text{H}_{38}\text{O}_{27}+\text{Na}$: 937.1493).

Epigallocatechin 3-*O*-gallate (7): $^1\text{H-NMR}$ (acetone- d_6 + D_2O) δ : 7.01 (2H, s, galloyl-H), 6.63 (2H, s, H-2', 6'), 6.02 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.00 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 5.45 (1H, br dd, H-3), 5.01 (1H, s, H-2), 3.00 (1H, dd, $J = 5.5, 17.5$ Hz, H-4), 2.89 (1H, dd, $J = 2.0, 17.5$ Hz, H-4). $^{13}\text{C-NMR}$ (acetone- d_6 + D_2O) δ : 166.4 (galloyl C-7), 157.5, 157.3, 156.7 (each 1C, C-5, 7, 8a), 146.0, 145.7 (each 2C, C-3', 5', galloyl C-3, 5), 138.8 (galloyl C-4), 132.9 (C-4'), 130.5 (C-1'), 121.4 (galloyl C-1), 109.8 (galloyl C-2, 6), 106.5 (C-2', 6'), 98.6 (C-4a), 96.3 (C-6), 95.5 (C-8), 77.9 (C-2), 69.6 (C-3), 26.4 (C-4).

Actinidione (8): $^1\text{H-NMR}$ (MeOH- d_4) δ : 7.02 (1H, dd, $J = 2.0, 8.0$ Hz, H-16), 6.83 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-17), 6.81 (1H, s, H-19), 3.99 (6H, s, -OMe $\times 2$), 3.64 (1H, t, $J = 9.5$ Hz, H-12), 2.80

(1H, dt, $J = 4.0, 4.0, 13.5$ Hz, H-14), 2.64 (1H, dt, $J = 4.0, 13.5, 13.5$ Hz, H-14), 2.33 (1H, m, H-8), 1.90 (1H, dt, $J = 4.0, 4.0, 13.5$ Hz, H-13), 1.74 (1H, m, H-9), 1.51-1.63 (1H, m, H-8, 10, 13), 1.33 (1H, m, H-9), 1.09 (1H, m, H-10), 0.89 (1H, m, H-11), 0.56 (1H, m, H-11). $^{13}\text{C-NMR}$ (MeOH- d_4) δ : 185.8 (C-6), 184.7 (C-3), 153.4 (C-18), 147.1 (C-7), 146.3 (C-4), 146.1 (C-5), 142.8 (C-2), 133.8 (C-15), 132.1 (C-19), 130.9 (C-16), 121.7 (C-1), 117.2 (C-17), 72.4 (C-12), 61.67, 61.70 (each 1C, -OMe), 41.3 (C-13), 35.3 (C-11), 34.6 (C-14), 27.8 (C-9), 27.0 (C-8), 25.1 (C-10).

Myricetin 3-*O*-(2''-*O*-galloyl)-rhamnoside (9): $^1\text{H-NMR}$ (MeOH- d_4) δ : 7.07 (2H, s, galloyl-H), 6.98 (2H, s, H-2', 6'), 6.35 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.18 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 5.63 (1H, dd, $J = 1.5, 3.5$ Hz, Rha H-2), 5.51 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, Rha H-1), 4.05 (1H, dd, $J = 3.5, 9.0$ Hz, Rha H-3), 3.45-3.52 (2H, m, Rha H-4, 5), 1.04 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, Rha H-6). $^{13}\text{C-NMR}$ (MeOH- d_4) δ : 178.0 (C-4), 166.1 (galloyl C-7), 164.5 (C-7), 161.8 (C-5), 158.0 (C-2), 157.1 (C-8a), 145.5 (C-3', 5'), 145.0 (galloyl C-3, 5), 138.6 (galloyl C-4), 136.6 (C-4'), 134.3 (C-3), 120.4 (C-1'), 119.9 (galloyl C-1), 109.0 (galloyl C-2, 6), 108.2 (C-2', 6'), 104.5 (C-4a), 99.1 (Rha C-1), 98.5 (C-6), 93.3 (C-8), 72.5 (Rha C-4), 72.1 (Rha C-2), 70.8 (Rha C-5), 69.4 (Rha C-3), 16.4 (Rha C-6).

(*R*)-Myricanol 5-*O*-(6'-*O*-galloyl)-glucoside (10): $[\alpha]_D -83.7^\circ$ ($c = 0.01$, MeOH), $^1\text{H-NMR}$ (acetone- d_6 + D_2O) δ : 7.10 (1H, br d, $J = 2.0$ Hz, H-18), 7.08 (2H, s, galloyl-H), 7.02 (1H, dd, $J = 2.0, 8.5$ Hz, H-15), 6.81 (1H, s, H-19), 6.79 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-16), 4.95 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, Glc H-1), 4.54 (1H, dd, $J = 2.0, 12.0$ Hz, Glc H-6), 4.36 (1H, dd, $J = 5.0, 12.0$ Hz, Glc H-6), 3.87, 3.96 (each 3H, s, -OMe), 3.87 (1H, m, overlapped, H-11), 3.60 (1H, m, Glc H-5),

3.51-3.57 (3H, m, Glc H-2-H-4), 2.86-2.91 (2H, m, H-7, 13), 2.77 (1H, m, H-13), 2.54 (1H, m, H-7), 2.19 (1H, m, H-12), 1.71-1.80 (2H, m, H-8, 10), 1.58-1.67 (2H, m, H-8, 12), 1.44-1.53 (2H, m, H-9, 10), 1.32 (1H, m, H-9). $^{13}\text{C-NMR}$ (acetone- d_6 + D_2O) δ : 166.8 (galloyl C-7), 152.5 (C-17), 149.7 (C-5), 148.3 (C-3), 146.0 (3C, C-4, galloyl C-3, 5), 138.7 (galloyl C-4), 134.4 (C-18), 131.7 (C-14), 131.3 (C-6), 130.8 (C-15), 129.8 (C-19), 129.0 (C-2), 125.7 (C-1), 121.5 (galloyl C-1), 117.1 (C-16), 109.8 (2C, galloyl C-2, 6), 105.3 (Glc C-1), 77.4 (Glc C-3), 75.3 (Glc C-2), 75.1 (Glc C-5), 71.0 (Glc C-4), 68.5 (C-11), 63.9 (Glc C-6), 61.7, 61.9 (each 1C, -OMe), 40.2 (C-10), 35.5 (C-12), 27.8 (C-13), 27.1 (C-7), 26.5 (C-8), 23.6 (C-9). HR-ESI-MS: 671.2347 ($[\text{M-H}]^-$), Calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{39}\text{O}_{14}$: 671.2345).

(*S*)-Myricanol 5-*O*-(6'-*O*-galloyl)-glucoside (11): $[\alpha]_D +54.0^\circ$ ($c = 0.01$, MeOH), $^1\text{H-NMR}$ (MeOH- d_4) δ : 6.99 (1H, dd, $J = 2.0, 8.5$ Hz, H-15), 6.94 (2H, s, galloyl-H), 6.89 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-18), 6.74 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-16), 6.73 (1H, s, H-19), 5.04 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, Glc H-1), 4.38 (1H, dd, $J = 4.0, 12.0$ Hz, Glc H-6), 4.31 (1H, dd, $J = 2.0, 12.0$ Hz, Glc H-6), 3.90, 3.93 (each 3H, s, -OMe), 3.75 (1H, t, $J = 10.0$ Hz, H-11), 3.44-3.54 (4H, m, Glc H-2-H-5), 2.73-2.86 (3H, m, H-7, 7, 13), 2.62 (1H, m, H-13), 1.92 (1H, m, H-12), 1.62-1.75 (2H, m, H-8, 8), 1.57 (1H, m, H-10), 1.48 (1H, m, H-12), 1.31 (1H, m, H-10), 1.23 (1H, m, H-9), 1.11 (1H, m, H-9). $^{13}\text{C-NMR}$ (MeOH- d_4) δ : 168.4 (galloyl C-7), 152.6 (C-17), 149.9 (C-5), 148.7 (C-3), 146.6 (C-4), 146.5 (2C, galloyl C-3, 5), 139.8 (galloyl C-4), 135.0 (C-18), 132.4 (C-6), 132.1 (C-14), 131.0 (C-15), 130.4 (C-19), 130.0 (C-2), 126.2 (C-1), 121.4 (galloyl C-1), 117.2 (C-16), 110.1 (galloyl C-2, 6), 105.0 (Glc C-1), 77.8 (Glc C-3), 75.6 (Glc C-2), 75.4 (Glc C-5), 71.9

(Glc C-4), 68.9 (C-11), 65.1 (Glc C-6), 62.1 (2C, -OMe), 40.3 (C-10), 35.2 (C-12), 27.8 (C-7), 27.2 (C-13), 27.0 (C-8), 23.6 (C-9). HR-ESI-MS: 671.2352 ([M-H]⁻, Calcd for C₃₄H₃₉O₁₄: 671.2345).

Myricanone 5-*O*-(6'-*O*-galloyl)-glucoside (**12**): ¹H-NMR (500 MHz, MeOH-*d*₄) δ: 7.01 (1H, dd, *J* = 2.5, 8.0 Hz, H-15), 6.99 (2H, s, galloyl-H), 6.76 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-16), 6.50 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-18), 6.49 (1H, s, H-19), 5.04 (1H, d, *J* = 7.0 Hz, Glc H-1), 4.38 (2H, m, Glc H-6), 3.84, 3.92 (each 3H, s, -OMe), 3.48-3.52 (4H, m, Glc H-2-H-5), 2.82-2.92 (4H, m, H-12, H-7, H-13), 2.55-2.65 (3H, m, H-10, H-7, H-12), 2.26 (1H, m, H-10), 1.82 (1H, m, H-8), 1.66 (1H, m, H-8), 1.47 (2H, m, H-9). ¹³C-NMR (126 MHz, MeOH-*d*₄) δ: 215.6 (C-11), 168.3 (galloyl-7), 152.9 (C-17), 149.9 (C-5), 149.0 (C-3), 146.7 (C-4), 146.6 (2C, galloyl-3, 5), 139.9 (galloyl-4), 134.0 (C-18), 132.5 (C-14), 130.0 (2C, C-2, 15), 129.9 (C-19), 129.8 (C-6), 126.3 (C-1), 121.5 (galloyl-1), 117.5 (C-16), 110.1 (2C, galloyl-2, 6), 105.0 (Glc C-1), 77.8 (Glc C-3), 75.7 (Glc C-2), 75.5 (Glc C-5), 71.7 (Glc C-4), 62.0, 62.1 (each 1C, -OMe), 44.7 (C-10), 42.3 (C-12), 28.0 (C-13), 27.9 (C-7), 25.7 (C-8), 23.4 (C-9). HR-ESI-MS: 669.2163 [M-H]⁻ (calcd for C₃₄H₃₈O₁₄-H, 669.2189).

Myricanol 11-*O*-sulfate (**13**): [α]_D -28.6° (*c* = 0.005, MeOH), ¹H-NMR (500 MHz, MeOH-*d*₄) δ: 7.13 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-18), 7.01 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.5 Hz, H-15), 6.91 (1H, s, H-19), 6.75 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-16), 4.71 (1H, t, *J* = 9.5 Hz, H-11), 3.83, 3.89 (each 3H, s, -OMe), 3.03 (1H, m, H-13), 2.79 (1H, m, H-13), 2.72 (1H, m, H-7), 2.53 (1H, ddd, *J* = 2.0, 12.5, 17.5 Hz, H-7), 2.16-2.26 (2H, m, H-8, 12), 2.10 (1H, m, H-10), 1.80-1.91 (3H, m, H-8, 10, 12), 1.71 (1H, m, H-9), 1.48 (1H, m, H-9). ¹³C-NMR (126 MHz, MeOH-*d*₄) δ: 152.5 (C-17), 150.3 (C-5), 148.4

(C-3), 141.0 (C-4), 134.2 (C-18), 132.4 (C-14), 130.70, 130.73 (each 1C, C-15, 19), 126.5 (C-1), 124.4 (C-2), 124.1 (C-6), 117.5 (C-16), 78.6 (C-11), 61.5, 61.6 (each 1C, -OMe), 37.5 (C-10), 34.4 (C-12), 27.9 (C-13), 26.8 (C-7), 26.2 (C-8), 24.1 (C-9). HR-ESI-MS: 437.1267 [M-H]⁻ (calcd for C₂₁H₂₆O₈S₁-H, 437.1276).

Juglanin B 11-*O*-sulfate (**14**): [α]_D +23.2° (*c* = 0.005, MeOH), ¹H-NMR (500 MHz, MeOH-*d*₄) δ: 7.22 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-18), 6.96 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.5 Hz, H-15), 6.92 (1H, br s, H-19), 6.71 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-16), 6.66 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-5), 4.84 (1H, t, *J* = 9.5 Hz, H-11), 3.83 (3H, s, -OMe), 3.05 (1H, m, H-13), 2.93 (1H, m, H-7), 2.75 (1H, m, H-13), 2.48 (1H, m, H-7), 2.27 (1H, m, H-8), 2.21 (1H, m, H-12), 2.13 (1H, m, H-10), 1.78-1.93 (4H, m, H-8, 9, 10, 12), 1.50 (1H, m, H-9). ¹³C-NMR (126 MHz, MeOH-*d*₄) δ: 154.7 (C-17), 150.2 (C-4), 144.4 (C-3), 134.0 (C-18), 131.3 (C-14), 130.5 (C-6), 130.0 (C-15), 128.4 (C-2), 128.1 (C-1), 126.5 (C-19), 117.9 (C-16), 112.4 (C-5), 79.2 (C-11), 56.8 (-OMe), 37.8 (C-10), 34.9 (C-12), 31.7 (C-7), 27.8 (C-13), 27.3 (C-8), 24.3 (C-9). HR-ESI-MS: 407.1181 [M-H]⁻ (calcd for C₂₀H₂₄O₇S₁-H, 407.1170).

3. 化合物 12 の構造解析

化合物 **12** は淡黄色無晶形粉末として得られ、HR-ESI-MS の測定結果から分子量は C₃₄H₃₈O₁₄ であることが示された。

¹H-NMR スペクトル (図 4) では芳香族プロトン領域に 1H-singlet が 1 本, galloyl 基由来の 2H-singlet が 1 本, ABX 系シグナルが 1 組, 脂肪族プロトン領域にはメトキシ基由来の 3H-singlet が 2 本, グルコース 1 組のシグナルに加えて, 2 スピン系, 4 スピン系のシグナルが観察された。また, グルコース 6 位のプロトンが大きく低磁場シフトしていることが ¹H-¹H correlation spectroscopy (COSY)

(図5) から示されたことから、この位置に galloyl 基が結合していると推察された。¹³C-NMR スペクトル (図6) では 215 ppm 付近にカルボニル由来のシグナルが、脂肪族プロトン領域にはグルコース、メトキシ由来のシグナルに加えて 6 本のシグナルが観察された。また、heteronuclear single quantum coherence (HSQC) (図7) の測定からその 6 本のシグナルはいずれもメチレンカーボンであることが示され、その情報と NMR データとを考え合わせた結果、本化合物は myricanone (3) の配糖体に galloyl 基が結合した構造であると推察された。また、本化合物の NMR データが myricanone (3) のそれと非常に良い対応を示したことも、myricanone (3) を構成ユニットとして含むことを支持している。

各構成ユニットの結合位置を明らかにする目的で heteronuclear multiple bond connectivity (HMBC) の測定を行った結果、図8 に示す相関が観察されたことから、myricanone の 5 位にグルコースが結合し、そのグルコースの 6 位に galloyl 基が結合していることが明らかとなった。

また、グルコースの D-, L-については、化合物 12 の酸加水分解物に L-cystein methyl ester hydrochloride (5 mg/mL, pyridine 溶液) 100 μ L を加え 60°C, 1 時間反応させた後、*o*-tolyl isothiocyanate (5 mg/mL, pyridine 溶液) を加え 60°C, 1 時間反応させた溶液を同様の反応を行った D-, L-グルコースのそれと HPLC 比較することで D-グルコースであると確認した (D-グルコース: 24.4 分, L-グルコース: 21.3 分, 化合物 12: 24.2 分)。

さらに、本分解物について HPLC 分析で myricanone (3), gallic acid (4) を検出することで部分構造の確認を行った。

以上の化学的データから、本化合物の構造を 12 式に示すように決定した。

4. 化合物 13 の構造解析

化合物 13 は白色無晶形粉末として得られ、HR-ESI-MS の測定結果から分子量は $C_{21}H_{26}O_8S_1$ であることが示された。

¹H-NMR スペクトル (図9), ¹H-¹H COSY (図10) 及び HSQC (図11) から、芳香族プロトン領域に ABX 系シグナルが 1 組、1H-singlet が 1 本、脂肪族プロトン領域にはメトキシ由来の 2 本の 3H-singlet に加えて 7 スピン系のシグナルの存在が示唆され、それらを myricanol (2) と比較した結果、11 位のプロトンの大きな低磁場シフトを除いて非常に良い対応を示した。¹³C-NMR スペクトル (図12) の比較でも同様に 11 位のカーボンの大きな低磁場シフトが観察され、それ以外のシグナルが非常に良い対応を示したことから、この位置が硫酸エステル化していることが示唆された。また、IR スペクトル (図13) において 1231 cm^{-1} に S-O 伸縮に特徴的なシグナルが観察されたことも硫酸エステルの存在を支持している。

構造の確証を得るために HMBC の測定を行った結果、図14 に示す相関が観察されたことから、各構成単位の位置に矛盾が無いことを確認した。

以上の結果から、本化合物の構造を myricanol 11-O-sulfate と決定した。

5. 化合物 14 の構造解析

化合物 14 は白色無晶形粉末として得られ、HR-ESI-MS の結果から分子量は $C_{20}H_{24}O_7S_1$ と示された。

¹H-NMR スペクトル (図15) では化合物 13 と同様に 11 位のプロトンが大きく低磁場シフトしていることから、類似の硫酸エステル体であることが示唆された。また、IR スペクトル (図16) で 1242 cm^{-1} に S-O 伸縮に特徴的なシグナルを観察したことも、その部分構造の存在を示唆している。¹H-¹H COSY (図17) 及び HSQC (図18) による帰属か

ら、本化合物の $^1\text{H-NMR}$ は **13** と非常に良い対応を示したが、化合物 **13** では芳香族プロトン領域で 1H-singlet で観察されたシグナルが本化合物では 1H-doublet ($J = 2.0 \text{ Hz}$) $\times 2$ 本として観察されたこと、及びメトキシ由来の 3H-singlet が 1 本しか認めなかったことから、**13** とは部分構造が異なる化合物であると示唆された。

構造を明らかにする目的で HMBC の測定を行った結果、図 19 に示す相関が観察されたことから、メトキシ基及び水酸基の結合位置を決定した。

以上の化学的データから、本化合物の構造を juglanin B 11-*O*-sulfate と決定した。

6. 抽出エキスの分析

熱水抽出物、50%エタノール抽出物、80%エタノール抽出物、エタノール抽出物、メタノール抽出物をメタノールに溶解させフィルター (0.22 μm) 処理後、HPLC 分析によって図 20 (a~e) に示すクロマトグラムを得た。各抽出物について、成分精査で得た下記 14 種の化合物を標準試料として直接比較を行った結果、いずれの抽出物においても myricitrin (**1**) を主成分として認めた。その他の成分についてはいずれも微量しか含まれておらず、抽出方法による差異は殆ど認めなかったが、ORAC 法による抗酸化能評価においては 80%エタノール抽出物が最も強い活性を示したことから、myricitrin (**1**) 以外の抗酸化活性化合物の相対的な含量比によってその機能性に若干の差異が生じる可能性が示唆された。

1: myricitrin

2: myricanol

3: myricanone

4: gallic acid

5: myricetin

6: prodelphinidine 3,3'-*O*-gallate

7: epigallocatechin 3-*O*-gallate

8: actinidione

9: myricetin 3-*O*-(2''-*O*-galloyl)-glucoside

10: (*R*)-myricanol 5-*O*-(6'-*O*-galloyl)-glucoside

11: (*S*)-myricanol 5-*O*-(6'-*O*-galloyl)-glucoside

12: myricanone 5-*O*-(6'-*O*-galloyl)-glucoside

13: myricanol 11-*O*-sulfate

14: juglanin B 11-*O*-sulfate

D. 結論

ヤマモモ抽出物の ORAC を指標とした抗酸化能評価の結果、80%エタノール抽出物に最も強い活性 (9,757 $\mu\text{mol TE/g}$) を認めた。また、80%エタノール抽出物の詳細な成分精査を行い、3 種の文献未記載の化合物 [myricanone 5-*O*-(6'-*O*-galloyl)-glucoside, myricanol 11-*O*-sulfate, juglanin B 11-*O*-sulfate] を含む計 14 種の化合物を単離し、それらの構造を明らかにした。また、得られた化合物を標準試料として各抽出エキス (熱水抽出物、50%エタノール抽出物、80%エタノール抽出物、エタノール抽出物、メタノール抽出物) との HPLC による直接比較を行った結果、いずれの抽出物においても主成分は myricitrin (**1**) であった。myricitrin (**1**) はヤマモモ抽出物の主要成分とされており、本抽出物の強い抗酸化活性はそれに起因するものと推察されるが、今回の検討において 80%エタノール抽出物が最も強い抗酸化活性を示した背景には、それ以外のフェノール性化合物 [myricanol (**2**), epigallocatechin 3-*O*-gallate (**7**) 等] の活性も少なからず寄与しているものと考えられ、それらも含めて効率的に抽出することができる方法として 80%エタノールが適切である可能性が示唆された。

E. 参考文献

- 1) Akazawa H., Fujita Y., Banno N., Watanabe K., Kimura Y., Manosroi J., Akihisa T., Three new cyclic diarylheptanoids and other

- phenolic compounds from the bark of *Myrica rubra* and their melanogenesis inhibitory and radical scavenging activities, *J. Oleo Sci.*, **59** (4), 213-221, 2010
- 2) Liu J. X., Di D. L., Huang X. Y., Li C., Two new diarylheptanoids from the pericaps of *Juglans regia* L., *Chin. Chem. Lett.* **18**, 943-946, 2007.
- 3) Tanaka T., Nakashima T., Ueda T., Tomii K., Kouno I., Facile discrimination of aldose enantiomers by reversed-phase HPLC, *Chem. Pharm. Bull.* **55** (6), 899-901, 2007.
- 4) Huang D., Ou B., Hampsch-W. M., Flanagan A. J., Prior L. R., High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format, *J. Agric. Food Chem.* **50**, 4437-4444, 2002
- 5) Ou B., Hampsch-W. M., Prior L. R., Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe, *J. Agric. Food Chem.* **49**, 4619-4626, 2001

F. 研究業績

1. 論文発表

現在のところなし

2. 学会発表

- 1) 好村 守生, 天倉 吉章, 吉田 隆志 : ヤマモモ (*Myrica rubra*) の抗酸化性成分. 日本薬学会第 131 年会 (2011.3).

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

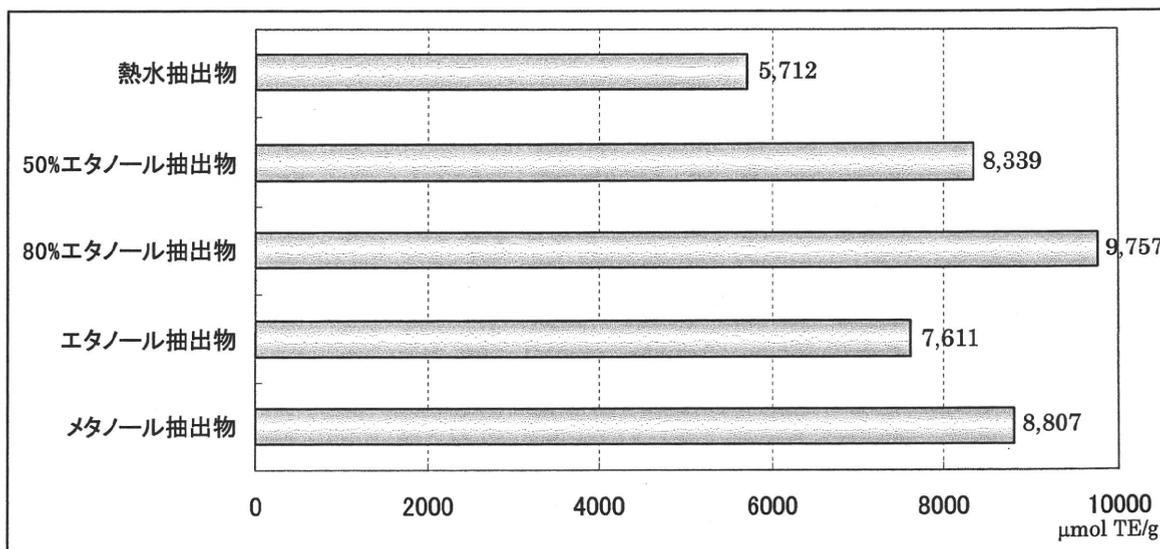


図 1. ヤマモモ抽出エキスの ORAC 値

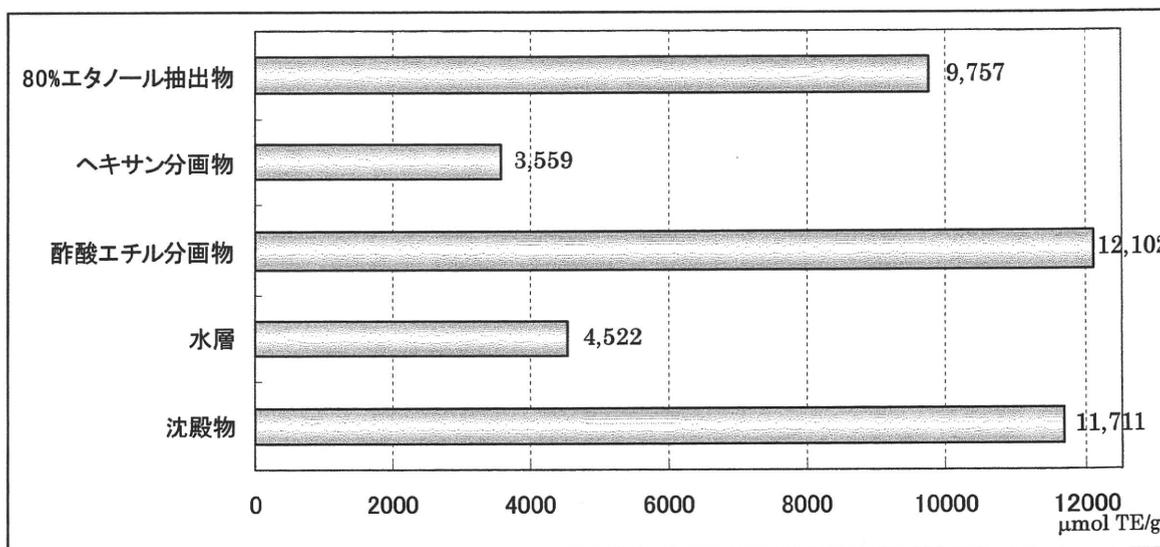


図 2. ヤマモモ 80%エタノール抽出エキス分画物の ORAC 値

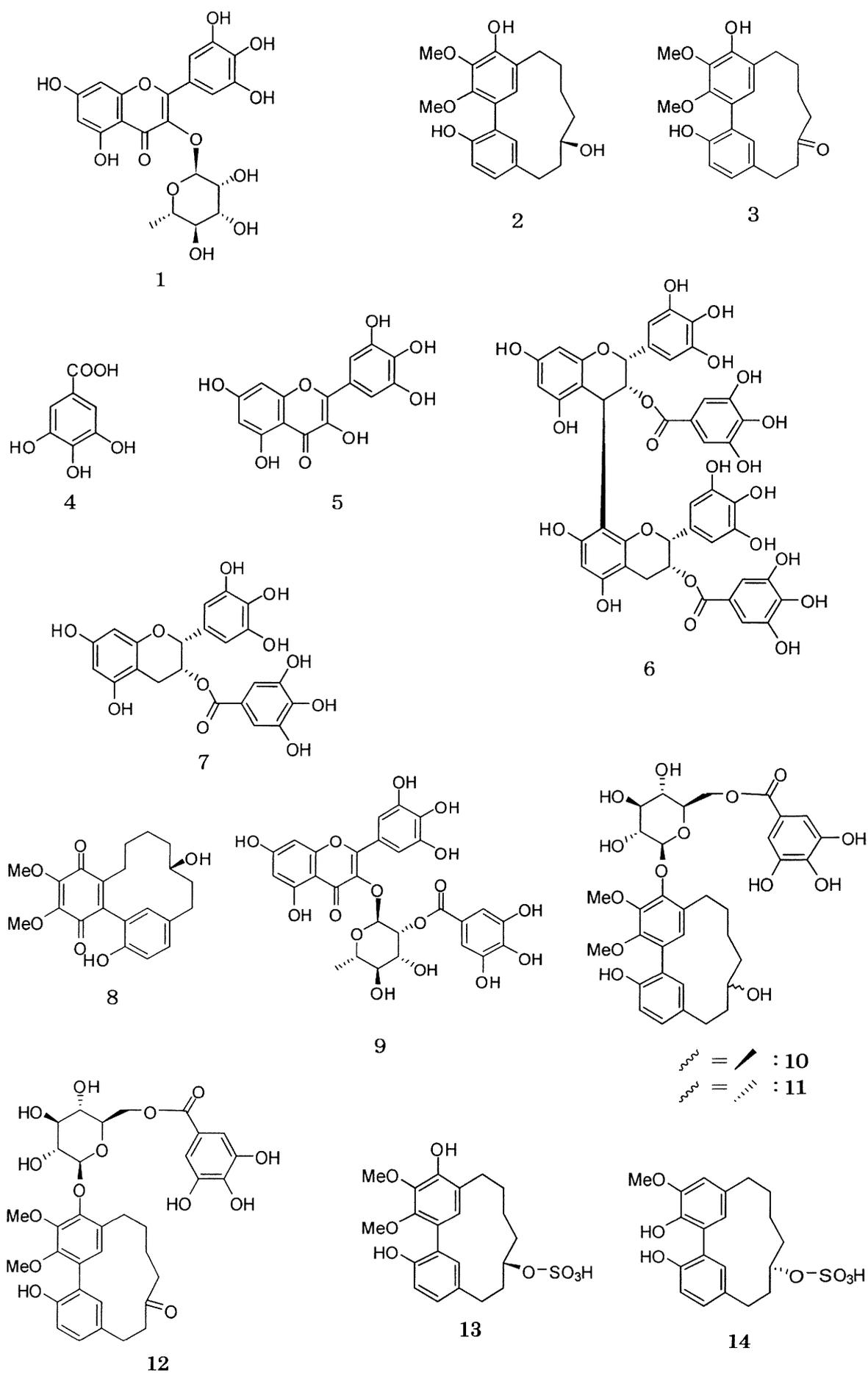


図 3. 化合物 1~14 の化学構造

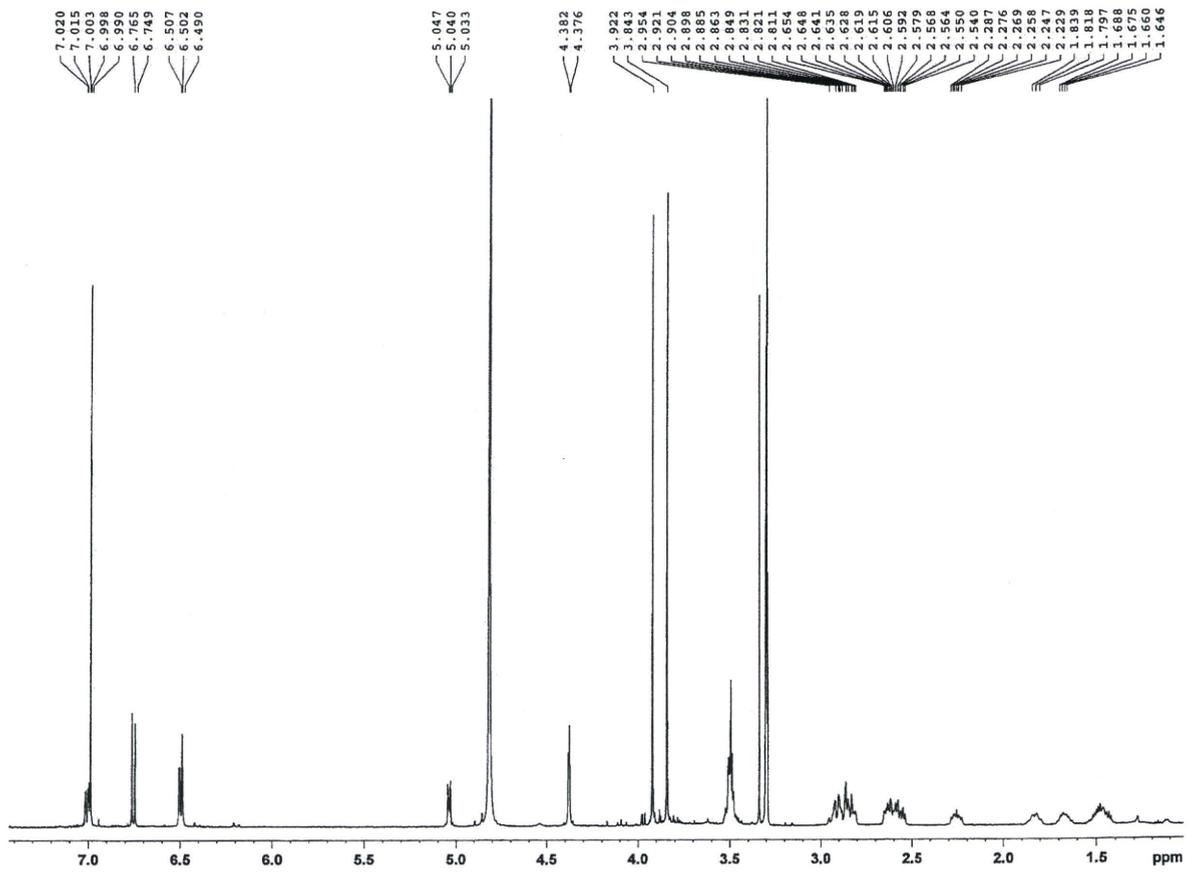


图 4. $^1\text{H-NMR}$ Spectrum of myricanone 5-*O*-(6'-*O*-galloyl)-glucoside (12)

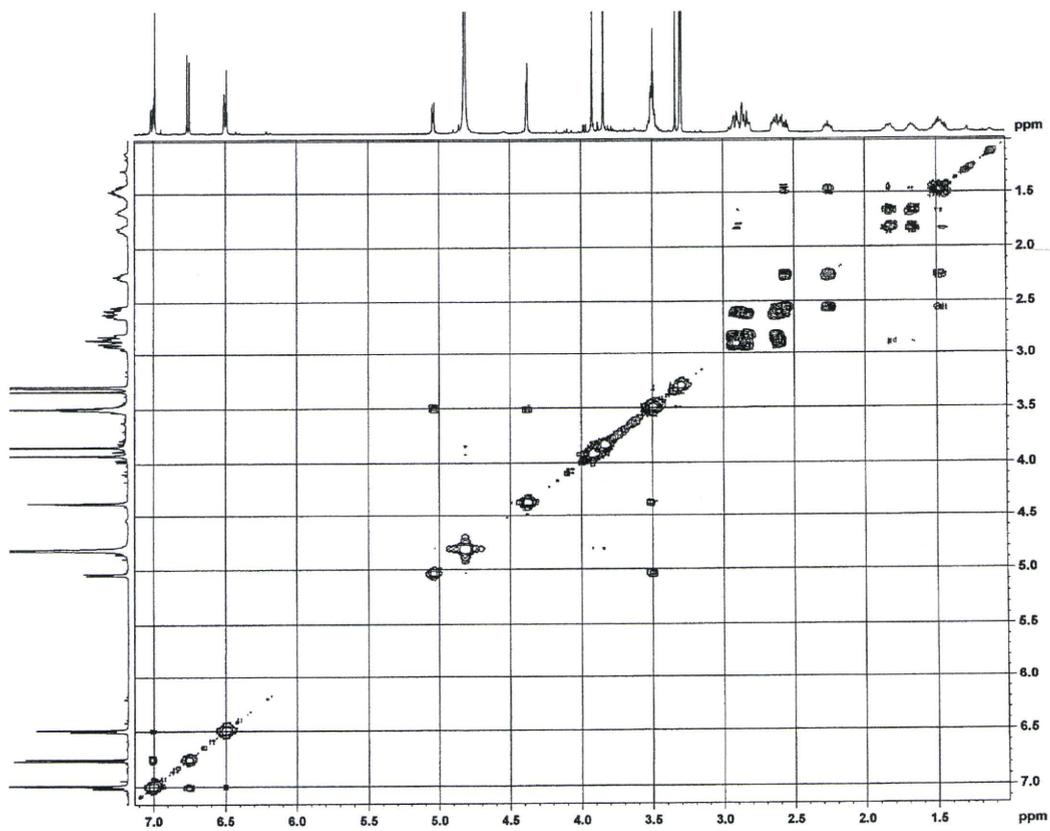


图 5. $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY Spectrum of myricanone 5-*O*-(6'-*O*-galloyl)-glucoside (12)